

Efecto de diferentes tiempos de contacto con agua electroactivada sobre la reducción de contaminantes químicos y biológicos en lechuga

Cap, Mariana ⁽¹⁾; Rojas, Dante ⁽¹⁾, Fernandez, Mariano ⁽¹⁾, Fulco, Micaela ⁽³⁾; Rodriguez, Anabel ^(1,2); Soteras, Trinidad ⁽¹⁾; Cristos Diego ⁽¹⁾, Mozgovej, Marina ^(1,2,3)

⁽¹⁾ *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto Tecnología de Alimentos, Argentina.*

⁽²⁾ *National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), n/a, Argentina*

⁽³⁾ *Universidad de Morón, Argentina*

RESUMEN

En la Argentina, el consumo per cápita de lechuga es de 19 kilos por año y es considerada como la verdura de hoja más importante dentro del grupo de hortalizas. Sin embargo, el consumo de lechuga fresca puede representar un riesgo para los consumidores en términos de inocuidad, ya que puede vehiculizar contaminantes químicos y/o biológicos y desencadenar enfermedades transmitidas por alimentos. En los últimos años, el agua electroactivada (AE) ha sido reconocida como agente sanitizante. Sus principales ventajas son: desinfección efectiva, fácil de usar, relativamente económica y ambientalmente amigable. En el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes tiempos de contacto con agua electroactivada para reducir contaminantes biológicos y químicos en lechuga. Se realizaron 3 ensayos. En el primero, muestras de lechuga fueron inoculadas con un pool de cepas autóctonas de *Salmonella spp* a una concentración final de 7 log UFC/g. En el segundo, muestras de lechuga fueron inoculadas con Imidacloprid a una concentración final de 0,7 mg/kg. El tratamiento con AE se aplicó sumergiendo cada muestra en 100 ml de solución con una concentración de 50 ppm de cloro libre. Los tiempos de contacto evaluados fueron: 15, 30 y 45 s. El recuento de *Salmonella spp* pos tratamiento se estimó por recuento en placa de xilosa lisina desoxicolato. La cuantificación de Imidacloprid se realizó mediante una técnica de extracción de residuos seguida por espectrometría de masas y por una separación analítica por cromatografía líquida. Como muestras control se utilizaron muestras inoculadas y tratadas con agua de canilla por 15, 30 y 45 segundos. Una vez identificado el tiempo de contacto más efectivo, se analizaron los atributos color, perfil de textura y sabor mediante análisis instrumental y sensorial. Cada ensayo se realizó tres veces con dos réplicas por ensayo. Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA de una vía, en el análisis sensorial se aplicó un ANOVA con dos factores y la prueba Tukey como test de comparación de medias.

Tras el análisis de los resultados, se observó que el tiempo de contacto más efectivo para reducir, tanto *Salmonella spp* como Imidacloprid, fue 45 s. En este tiempo, la reducción en el recuento de *Salmonella spp* fue de 4 log UFC/g y la reducción de Imidacloprid fue de un 48%, valores estadísticamente diferentes de los otros tiempos analizados. Entre los tratamientos de 15 y 30 s no se observaron diferencias significativas. La reducción logarítmica en el recuento de *Salmonella spp* fue de 3 log UFC/g y la reducción de Imidacloprid fue de un 29%. Con respecto al efecto sobre *Salmonella spp*, todos los tratamientos con AE se diferenciaron de las muestras control. Con respecto al efecto sobre Imidacloprid sólo el tratamiento de 45 s se diferenció de las muestras control. Con respecto a los atributos de calidad, el perfil de textura y sabor no fueron afectados por el tratamiento. En cuanto al color, en el análisis sensorial, se percibió un color ligeramente más claro en lechugas tratadas mientras que en el análisis instrumental no se observó diferencias. Por lo tanto, consideramos que la utilización del AE durante 45 s resultó ser una alternativa efectiva para reducir *Salmonella spp* e Imidacloprid en lechuga y mejorar la inocuidad del producto sin afectar su calidad.

1. INTRODUCCIÓN

La lechuga (*Lactuca sativa*) es uno de los vegetales de hojas más populares en el mundo. El alto nivel de consumo está asociado con el hecho de que es baja en calorías y grasas, es una buena fuente de vitaminas, minerales, proteínas, fibras y compuestos fitoquímicos. Sin embargo, el consumo de lechuga cruda puede representar un riesgo para los consumidores en términos de seguridad alimentaria, ya que puede transportar contaminantes químicos y / o biológicos (Pang & Hung, 2016). Los contaminantes químicos más importantes son los residuos de pesticidas (Carozza, y col. 2009). El Imidacloprid es un insecticida que se ha utilizado ampliamente para controlar las plagas, particularmente en vegetales (Lu y col. 2018) y se considera levemente tóxico para los humanos, ya que numerosos informes indican que tiene efectos adversos en mamíferos (Mikolić y Karačonji, 2018). Con respecto a los contaminantes biológicos, uno de los patógenos que más se han aislado en lechugas y ensaladas con productos vegetales frescos es la *Salmonella spp* (Olaimat y Holley, 2012), siendo la principal causa de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Jeddi y col., 2014; Mattia y Manikonda, 2018). El agua electroactivada (AE) es una alternativa prometedora para la descontaminación de alimentos debido a su rentabilidad, facilidad de aplicación, descontaminación efectiva y no tiene efectos perjudiciales ni para la salud pública ni para el medio ambiente (Rahman, y col., 2010). El AE es generado por la electrólisis del agua que contiene un electrolito, como cloruro

de sodio, cloruro de potasio o ácido clorhídrico diluido. El proceso electrolítico permite la conversión de iones cloruro (Cl_2 , HOCl / ClO^-), dentro de la cámara anódica. A un pH ácido a neutro, se forman especies de ácido hipocloroso con alto potencial de oxidación-reducción (ORP), componentes antimicrobianos activos (Hricova y col., 2008). Pocos estudios sistemáticos evalúan la eficiencia de AE para reducir no solo contaminantes biológicos sino también químicos y los posibles efectos sobre los parámetros de calidad de la lechuga y atributos sensoriales. Para el caso, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de los diferentes tiempos de contacto de AE para reducir la población de *Salmonella* y las concentraciones de Imidacloprid en lechuga iceberg inoculada artificialmente. Una vez identificado el tiempo de contacto más efectivo, se evaluaron los efectos sobre los parámetros de calidad de la lechuga y los atributos sensoriales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 *Lechuga*

La lechuga iceberg se adquirió en un supermercado local y se almacenó a 4 ° C. Los ensayos se realizaron dentro de las 24 hs posteriores a la llegada.

2.2 *Tratamiento de agua electroactivada (AE)*

El tratamiento se realizó sumergiendo muestras en 100 ml de solución de AE (50 ppm de cloro libre disponible). Se evaluaron cuatro tiempos de contacto: 0, 15, 30 y 45 s. Las muestras de control fueron tratadas con agua corriente. Después del tratamiento, las muestras se envasaron individualmente y se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis.

2.3 *Diseño experimental y análisis estadístico.*

Cada tratamiento se realizó por triplicado, con tres muestras en cada réplica. Se realizó un análisis de varianza (One factor-ANOVA) utilizando el paquete de software SPSS, versión 21 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.). Los datos del análisis sensorial se analizaron mediante un análisis de varianza de dos factores (muestra y evaluador). Las diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de Tukey (Rogers, 2017).

2.4 *Experimento 1: Efecto del tiempo de contacto en la reducción de Salmonella spp inoculada en lechuga*

2.4.1 *Cepas bacterianas y preparación del inóculo*

Las cepas de *Salmonella* utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Dr. Pablo Chacana del Instituto de Patobiología, INTA Castelar. Las cepas se aislaron originalmente en diferentes etapas de la cadena alimentaria y se identificaron como *S.*

Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Heidelberg* y *S. Schwarzengrund*. Los subcultivos se prepararon inoculando un tubo de ensayo con 10 ml de caldo de soja tríptico (TSB, Oxoid, Reino Unido) con un crecimiento de colonias únicas en agar Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD, Oxoid, Reino Unido), y se incubaron individualmente a 37 ° C durante la noche. Las células se cosecharon por centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos y los gránulos se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2, Oxoide) para dar una concentración aproximada de 10⁸ UFC / ml. El conjunto de cepas se preparó mezclando volúmenes iguales de cada cepa en PBS.

2.4.2 Contaminación microbiana artificial y procedimiento de tratamiento

Las hojas de lechuga se cortaron asépticamente en trozos de 10 g. Cada muestra se inoculó por puntos con 100 ml de suspensión de cepas mixtas para obtener una concentración final de 7 log UFC / g y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente en cabina de seguridad biológica, en condiciones estériles. Las muestras no inoculadas se incluyeron como control de materia prima.

2.4.3 Análisis microbiológico.

Las muestras se transfirieron a bolsas de stomacher estériles y se añadieron 90 mL de agua con peptona al 0,1% (PW, Biokar, Francia). Las muestras se mezclaron con un stomacher (Easy Mix, AES, Francia) durante 60 s y se prepararon diluciones en serie. Los recuentos de *Salmonella* se realizaron en agar Tripticasa soja (TSA, Biokar, Francia). Todas las placas (por duplicado) se incubaron a 37 ° C.

2.5 Experimento 2: Efecto del efecto del tiempo de contacto en Imidacloprid inoculado en lechuga

2.5.1 Preparación de la solución de trabajo de Imidacloprid y estándares de calibración

El estándar de Imidacloprid se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MN). Se preparó una solución madre en acetonitrilo a 1 mg / ml. Los estándares se prepararon a concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ng / ml en el extracto de matriz en blanco. Todas las soluciones estándar se almacenaron a -20 °C.

2.5.2 Contaminación química artificial y procedimiento de tratamiento

La lechuga se inoculó pulverizando con una solución acuosa de Imidacloprid para obtener una concentración final de 0,7 mg / kg y se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente, en una cabina de seguridad biológica, en condiciones estériles. Las muestras no inoculadas se incluyeron como control de materia prima.

2.5.3 Extracción de muestra

El procedimiento de extracción de QuEChERS (AOAC 2007.01) se usó para la extracción y limpieza de muestras.

2.5.4 Cromatografía líquida

Los análisis se realizaron usando un equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento Waters Acquity (UPLC) equipado con un detector de masa cuadrupolo simple usando una columna XBridge BEH C18 de 2.5 μm 2.1 \times 150 mm y ácido acético al 0.1% en agua: metanol como la fase móvil. El modelo de registro de iones únicos (SIR) se utilizó en el análisis de cuantificación con el modo positivo ESI del espectrómetro de masas, el tiempo de retención y la abundancia del ion de confirmación (Ion C) m / z: 256 parientes con respecto al ion de cuantificación (Ion Q) m / z: 175 fueron utilizados como criterios de identificación.

2.6 Experimento 3: Efecto del tratamiento AE en los parámetros de calidad de lechuga

Los parámetros de calidad se evaluaron en lechugas no contaminadas tratadas con AE (50 ppm) durante 45 s. Todas las determinaciones se llevaron a cabo después de 24 h de almacenamiento, por triplicado y se compararon con un control (muestras sin tratar).

2.6.1 Análisis de parámetros cromáticos.

Los parámetros cromáticos se analizaron con un colorímetro Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc. Osaka, Japón). Se realizaron 15 mediciones por cada réplica. Los parámetros L *, a* y b*, ángulo de tono (h), cromaticidad (C *) y diferencia de color total (ΔE) se obtuvieron mediante el software del equipo.

2.6.2 Análisis de perfil de textura

El perfil de textura se realizó con un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA.XT plus (Stable Micro Systems, Reino Unido). Parámetros: velocidad de ensayo 1 mm / s, sonda de aguja (P / 2N) y celda de carga de 5 kg. Se midieron 3 muestras apiladas (5 por 5 cm) en 5 puntos seleccionados al azar por cada replicado. La dureza (Fuerza máxima, g) y la resistencia al corte (área bajo la curva, g.s) se registraron mediante el software del equipo.

2.6.3 Análisis sensorial

Los atributos sensoriales se evaluaron mediante una prueba de diferencia contra un control direccionada a crujencia y color y una prueba de similitud triangular para evaluar el sabor.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Experimento 1: Efecto del tiempo de contacto sobre la reducción de Salmonella spp inoculada en lechuga

El recuento de *Salmonella* en muestras no tratadas fue de 7,19 log UFC / g. Los recuentos de *Salmonella* en las muestras tratadas con agua corriente fue de 5.63 log UFC / g, 5.47 log UFC / g y 5.65 log UFC / g, después de 15 s, 30 s y 45 s, respectivamente, siendo estadísticamente diferente de las muestras no tratadas, pero igual entre los diferentes tiempos de contactos. La reducción promedio después del tratamiento con agua corriente fue de 1,6 log UFC / g. Los recuentos de *Salmonella* en muestras tratadas con 50 ppm de AE fueron 4,13 log UFC / g, 4,46 log UFC / g y 3,13 log UFC / g después de 15 s, 30 s y 45 s, respectivamente. Los resultados fueron estadísticamente diferentes de las muestras no tratadas y de las muestras tratadas con agua corriente. Entre los tiempos de contacto, 15 s y 30 s fueron iguales y 45 s fue diferente ($P < 0.05$). La reducción promedio del registro de *Salmonella* después de un tratamiento AE durante 15 y 30 s fue de 2.9 log UFC / g y después de 45 s fue de 4.06 log UFC / g. Aunque el aumento en el tiempo de contacto de 15 a 30 s no afectó las reducciones del registro de *Salmonella*, el aumento de 30 a 45 s mejoró significativamente el efecto bactericida de AE. Pangloli y Hung (2011) también informaron que el aumento en el tiempo de contacto mejoró el efecto bactericida, pero, en contraste con lo que observamos, ese efecto se observó cuando el tiempo de contacto se extendió de 15 a 30 s. La diferencia podría explicarse por el hecho de que tanto el patógeno utilizado como las condiciones experimentales en los dos estudios no fueron idénticos. En cuanto a los valores absolutos de la reducción en la población de patógenos, Stopforth y col. (2016) y Guentzel y col., (2008) informaron números más bajos. Stopforth y col. (2016) demostraron que después de sumergir las verduras de hoja verde en 50 ppm de AE durante 60 y 90 s, las reducciones de log de *Salmonella* fueron 2,31 log UFC / g y 2,5 logs UFC / g, respectivamente. Guentzel y col. (2008) informaron que el tratamiento de las hojas de lechuga con 50 ppm de cloro residual total (TRC) durante 10 min redujo los recuentos de *Salmonella Tiphymurium* en 2,9 logs UFC / ml, medidos en agua de lavado. Las mayores reducciones observadas en el presente estudio pueden deberse al tiempo permitido para la fijación bacteriana. En el presente estudio, ese tiempo se estableció en 30 min, mientras que Guentzel y col., (2008) permitieron 4 hs y Stopforth y col. (2016), 2 hs. Los ensayos de desafío realizados en la carne, que permiten la fijación bactericida, son de períodos de 15 min (Kalchayanand y col., 2008). No hay consenso sobre el tiempo mínimo que debe permitirse para la fijación bacteriana. El apego inicial involucra interacciones hidrodinámicas y electrostáticas y ocurre rápidamente (aproximadamente ~ 1 min). El segundo paso del proceso de apego involucra las interacciones de van der Waals entre la región hidrofóbica de la pared celular exterior y la superficie y ocurre en un tiempo de spam no deseado de varias horas (Boks,

y col., 2008; Renner y Weibel, 2011). Treinta minutos en lugar de 2 hs como el tiempo permitido para la fijación bacteriana puede haber favorecido la actividad antimicrobiana de AE. Otra fuente de variabilidad entre los ensayos podrían ser las diferencias en las respuestas fenotípicas entre las cepas de la misma especie microbiana, un fenómeno bien abordado por Lianou y Koutsoumanis (2013).

3.2 Experimento 2. Efecto del tiempo de contacto en la reducción de Imidacloprid inoculado en lechuga

El Imidacloprid, es uno de los pesticidas más utilizados en la lechuga y hay poca información sobre la capacidad de AE para reducir su concentración. La concentración de Imidacloprid en muestras no tratadas fue de 0,70 mg / kg. Las concentraciones de Imidacloprid en las muestras tratadas con agua corriente fueron de 0.50 mg / kg, 0.46 mg / kg y 0.51 mg / kg después de 15 s, 30 s y 45 s de tiempo de contacto, respectivamente. La reducción promedio después del tratamiento del agua corriente fue del 30%. Las concentraciones de Imidacloprid en las muestras tratadas con 50 ppm de AE fueron de 0,53 mg / kg, 0,47 mg / kg y 0,36 mg / kg después de 15 s, 30 s y 45 s, respectivamente. La reducción promedio después del tratamiento de AE durante 15 o 30 s fue del 29%, mientras que después de 45 s fue del 49%. El único tratamiento que difiere de las muestras no tratadas y el resto de los tratamientos analizados fue el tratamiento AE durante 45 s ($P < 0.05$). Al-taher y col. (2013) evaluaron la efectividad del agua del grifo, hipoclorito de sodio (80 pg / ml, pH 7), ácido peroxiacético (80 pg / ml) y Tween 20 (0.1%) en la reducción de Imidacloprid de los tomates. Los autores demostraron que el tratamiento del agua fue tan efectivo como el ácido peroxiacético y, a su vez, más efectivo que el hipoclorito de sodio y Tween 20. Randhawa y col. (2018) midieron los niveles residuales de Imidacloprid en las espinacas después de aplicar diferentes tratamientos de lavado. Se observó una reducción del 47-50% después de sumergir la muestra durante 10 minutos a 30 ± 5 °C en las siguientes soluciones: 4% de ácido acético, 4% de ácido cítrico y 6% de peróxido de hidrógeno. En base a estos hallazgos, el tratamiento AE no solo logró reducciones similares en la concentración de Imidacloprid que otras soluciones de lavado, sino que también las logró en menos tiempo (45 s frente a 10 min). También se ha demostrado que AE es efectivo contra otros tipos de pesticidas (Qi y col., 2018)

3.3 Experimento 3. Efecto del tratamiento AE en los parámetros de calidad de lechuga

A partir de los resultados descritos anteriormente, se evaluó el efecto sobre los parámetros de calidad de la lechuga y los atributos sensoriales después del tratamiento con AE

(50 ppm) durante 45 s. Este tratamiento garantizó una reducción significativa de la contaminación microbiana y química. Los resultados obtenidos en las mediciones instrumentales de los parámetros cromáticos y el perfil de textura mostraron que el tratamiento AE no causó un impacto negativo en la calidad de la lechuga. Varios autores han reportado resultados similares con la aplicación del tratamiento AE a diferentes vegetales. Qi y col. (2018) estudiaron la aplicación del agua oxidante electrolizada en espinacas y habichuela e informaron que las muestras mantuvieron la luminosidad, la intensidad del color y la tonalidad verdosa después del tratamiento. Izumi (1999) informó que después del tratamiento de inmersión con AE (20 ppm) durante 3 minutos, el color de la superficie de las hojas de espinaca no se vio afectado. Yang, Swem y Li (2003) aplicaron soluciones con diferente pH e informaron que no se observó ningún cambio de color relevante en las lechugas después del tratamiento AE a pH 7, un pH similar al utilizado en nuestro trabajo (pH ~ 6). Park y col. (2001) informaron que el tratamiento de AE podría ser un desinfectante efectivo en la lechuga sin afectar el color y la textura de la misma. En cuanto al análisis sensorial, los panelistas no percibieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el perfil de textura y sabor, mientras que, en el color, los panelistas percibieron un color ligeramente más claro en las lechugas tratadas. Estos resultados están de acuerdo con lo informado por Puligundla, y col. (2018) en el estudio de brotes de brócoli lavados con agua electroactivada. El análisis sensorial realizado por los autores mostró que los brotes parecían cada vez más brillantes, más frescos y sin ningún aroma desagradable después del lavado AE. Aún así, consideramos que la diferencia percibida por los panelistas no afectaría la comercialización de la lechuga tratada por AE.

4. CONCLUSIÓN

Los resultados indicaron que el tiempo de contacto más efectivo para reducir tanto los recuentos de *Salmonella spp.* y el contenido de Imidacloprid fue de 45 s, alcanzando una reducción de 4 log UFC/g en los recuentos de *Salmonella* y un 49% de reducción en el contenido de Imidacloprid. Con respecto a los parámetros de calidad, el perfil de textura y sabor de las muestras no fueron afectados por el tratamiento. Sin embargo, en el análisis sensorial, los panelistas detectaron un color ligeramente más claro en las muestras tratadas con respecto al control. Aun así, consideramos que la aceptabilidad del producto no se encontraría afectada. Por lo tanto, el uso de agua electroactivada durante 45 s es una alternativa efectiva para reducir contaminantes químicos y biológicos, garantizando la seguridad y calidad de la lechuga.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Randhawa A. y col. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.144>
2. Al-haq, M. I. y col. (2005). <https://doi.org/10.3136/fstr.11.135>
3. Al-taher, F. y col. (2013). <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-240>
4. Boks, N. P. y col. (2008). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.08.021>
5. Carozza, S. E. y col. (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.06.002>
6. Guentzel, J. L. y col. (2008). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.08.003>
7. Hricova, D. y col. (2008). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1934>
8. Izumi, H. (1999). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15079.x>
9. Jeddi, M. Z. y col. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. J Health Popul Nutr., 32(3), 391–399.
10. Kalchayanand, N. y col. (2008). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18389711>
11. Lianou, A. y Koutsoumanis, K.P. (2013).
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>
12. Lu, C. y col. (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05596>
13. Mattia, D. D., & Manikonda, K. (2018). <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6202.pdf>
14. Mikolić, A., & Karačonji, I. B. (2018). <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3144>
15. Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>
16. Pang, Y.-H., & Hung, Y.-C. (2016). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13364>
17. Pangloli, P., & Hung, Y.-C. (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02219.x>
18. Park, C.M y col. (2001). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15216.x>
19. Puligundla, P. y col. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.044>
20. Qi, H. y col (2018). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.144>
21. Rahman, S. M. E y col. (2010). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.020>
22. Stopforth, J. D. y col. (2016). <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.3.625>
23. Yang, H. y col. (2003) <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08280.x>